

マウス頭蓋冠由来骨原性細胞株の分化と石灰化

著者	須藤 博子
号	1542
発行年	1984
URL	http://hdl.handle.net/10097/19633

氏 名（本籍） す どう ひろ こ
須 藤 博 子

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 1 5 4 2 号

学位授与年月日 昭 和 5 9 年 2 月 2 2 日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

最 終 学 歴 昭和48年3月
新潟大学理学部卒業

学 位 論 文 題 目 In Vitro Differentiation and Calcification in
a New Clonal Osteogenic Cell Line Derived
from Newborn Mouse Calvaria.
(マウス頭蓋冠由来骨原性細胞株の分化と石灰化)

(主 査)

論文審査委員 教授 森 富 教授 山 本 敏 行

教授 石 井 敏 弘

論文内容要旨

骨細胞のホルモンや薬物代謝の研究はマウスやラットの頭蓋冠から分離された初代培養細胞を用いて数多くなされてきたが、培養下で石灰化を行なわせた報告は少ない。1974年, Bindermanらがラット頭蓋冠由来の初代培養細胞による石灰化組織の形成について報告して以来, 骨形成能を有する細胞の分離・継代が試みられてきた。1981年, Williamsらが成熟ラットの頭蓋冠細胞およびそれから得られたクローンが継代後も石灰化能を保持していたと報告したが, 形態観察の結果, 石灰化巣にコラーゲン線維が認められないと述べていることから, 生体内のものとは異なった機構で石灰化がおこっているものと思われる。私は最近, 共同研究者の小玉, 天貝らと共にC57BL/6マウスの頭蓋冠から, 接触阻止現象に感受性の高い細胞を得ることのできる3T3方式を用いて8種類の株細胞を樹立した。その中から骨芽細胞のmarker enzymeであるalkaline phosphataseの活性が特に高い細胞株MC3T3-Eを選び, クローンMC3T3-E1を分離した。E1細胞を長期間培養すると局所において細胞間隙がAlizarin red S陽性を示し, 光顕的に石灰化することが確認されたので, MC3T3-E1細胞の分化および石灰化過程について形態学的に詳細な観察を行なった。

材料および方法

C57BL/6マウス新生仔頭蓋冠由来骨原性細胞株MC3T3-E1を 5×10^4 個/35 mm plastic dishの濃度で植え込み, 10%の新生コウシ血清を添加した α -MEMを用いて, 37°C, 5% CO₂条件下で培養した。培地交換は3日毎に行なった。光顕用試料についてはホルマリン固定ののち, alkaline phosphataseの組織化学的染色を施し, 電顕用試料については2% paraformaldehyde・2.5% glutaraldehyde 混合液固定およびオスミウム後固定を行ない, 樹脂包埋した。また2% potassium pyroantimonateを含む2.5% glutaraldehyde固定によりCaイオンの検出も行なった。さらに形成されたmineralについて微小部X線分析装置によりその成分を分析すると共に電子線回折像による結晶構造の検討も行なった。

結果および考察

骨原性細胞株MC3T3-E1は増殖期には線維芽細胞様の形態を示し, confluentになると敷石状を呈した。その後も細胞は増殖を続け, 多量の基質を合成しながら数層に重なりあうようになった。培養21日目になるとオスミウム固定を施した試料ではオスミウム濃染性のnoduleの点在が認められた。そのような部位では細胞層が一段と厚くもりあがっており, トルイジンブルー濃

染色性の骨芽細胞様の小さな細胞が集塊をなしており、膜性骨における骨化点の形成によく似た像を示した。また細胞間のコラーゲン線維性基質の形成は活発に行なわれ、線維の太さも増した。電顕的にはコラーゲン線維は60～70 nmの規則正しい横紋周期を有しており、これらの線維間には生体内と同様に二重膜で囲まれた無数の基質小胞が認められた。基質小胞は円形ないし楕円形のもが多く、直径約60～400 nmで、内部は比較的電子密度が高かった。培養日数の経過につれて nodule は大きさと数を増し、中心部はほとんど線維性の基質で占められるようになり、Golgi 装置や粗面小胞体のよく発達した骨芽細胞様の細胞が散在していた。nodule の周囲の細胞は同心円状に配列し、骨膜様を呈した。この時期になると基質小胞内に針状結晶が認められるようになり、次に小胞は結晶で満たされ、互いに癒合して大きな結晶塊の様相を呈した。さらに針状結晶は周囲のコラーゲン線維上にも配列するようになり、添加性石灰化が開始された。培養40日以降になると、nodule は肉眼にも白い点として認められ、光顕的には光の透過性が低く黒褐色を呈し、石灰化も広範囲に及ぶようになった。この時期になると骨芽細胞様の細胞は完全に mineral 内に封入され、骨細胞様になった。また一方では十分な栄養が得られず変性していく細胞も観察されるようになった。これらの nodule の細胞はほとんどが alkaline phosphatase 強陽性を示し、石灰化の強い部位の細胞は陰性であった。Ca イオンは細胞膜、Golgi 小胞、ミトコンドリアおよび基質小胞に calcium pyroantimonate の沈着物として認められた。形成された mineral の成分はカルシウムとリンで、そのモル比はハイドロキシアパタイトとほぼ等しく、結晶の電子線回折像はハイドロキシアパタイトのそれと一致した。これらの形態学的な観察結果はこの培養系において生体内の膜性骨における正常な骨形成に非常によく似た過程を経て石灰化組織が形成されることを示している。

MC3T3-E1 細胞はクローンであり、しかも骨形成能を保持している骨原性の細胞であることから、初代培養細胞の欠点を補い、今後の *in vitro* における骨細胞の代謝あるいは石灰化機構の研究にとってとても有効なモデルシステムとなるものと考ええる。

審 査 結 果 の 要 旨

骨形成の基本現象としての組織の石灰化を解明する目的で、例えば薬物やホルモン等の影響などの実験的研究が古くから試みられてきた。しかし、石灰化機構の解析には *in vitro* での組織の石灰化実験が大いに有用であることは論をまたない。そのような発想により、実験動物の頭蓋冠や鎖骨、あるいは体肢原基などを培養し、石灰化を行なわせる試みも報告されている。しかし、石灰化は発現しなかったり、発現しても再現性に乏しかったりして、期待するような成果は今まで得られていない。かつ、それらの試みの多くは初代培養であるので、異なる細胞間の相互作用を排除できず、細胞レベルでの解析を困難にしている。

須藤は共同研究者といわゆる 3 T 3 方式でマウス頭蓋冠由来の細胞株 MC 3 T 3 - E 1 を樹立し、それがコラゲン線維を含む基質を形成すると共に、高い再現性をもって石灰化することを見出した。この骨原性細胞株は、dish 内に confluent になった後も増殖し続け、多層化した小結節をつくり、その部の細胞間にはコラゲン細線維のほか、小沢のいう基質小胞も多数存在した。結節部の細胞は骨芽細胞様となり、培養 30 日で基質小胞内に、次いで小胞周囲のコラゲン細線維にミネラル結晶が沈着するようになった。結晶はハイドロキシアパタイトに近い Ca と P のモル比を有し、電子線回折像もアパタイトの結晶パターンとよく一致した。ミネラル沈着がすすむと、小結節は白点として見えるようになり、内に埋没した細胞は骨細胞様の形態を示した。これらの状況は、生体内結合組織における膜骨形成と酷似する現象がシャーレ内に現出されたものといえる。

この研究は以上のように、高い再現性をもって自然に近い石灰化現象を示す特有な細胞を培養株として樹立し、その石灰化過程を主として形態学的に明らかにした。これは、骨形成機構の解析にとってまことに期待できる実験系を確立したものであるということができるよう。学位授与に値するものと認める。